

Øyets limbale stamceller

Forfatter: Stud.med. Fredrik Stephansen, V-01, UiO.
Veileder: Prof. Bjørn Nicolaissen, UiO/UUS.

Prosjektoppgave i medisin

Universitetet i Oslo
Det medisinske fakultet



Abstract: Limbal stem cells of the eye.

Cornea is the outermost layer of the eye, facing the external world. The avascular and transparent cornea is histologically divided into six layers. From the surface and inwards: *corneal epithelium, basement membrane, Bowman's layer, stroma, Descemet's membrane and the endothelium*. The corneal epithelium is subject to amazingly challenging and specialized demands: It not only serves as an outer barrier against microbes and injuries, it also serves as an accurate optical medium. A constant self-renewal of the epithelium is therefore necessary. During the last decades, new understanding and knowledge on this area has greatly increased. The *limbus* is the transformation-zone between the cornea and the conjunctiva. It represents an exciting location on the eye. Certain stem cells, called *limbal stem cells (LSC)*, are proved to situate among the vascularized, basal layer of the limbus. The LSC are the source of mature corneal epithelium cells, via proliferation, transmigration and differentiation. Hence an injury or illness to the LSC will result in complications for the corneal epithelium. Acid or alkali burns, Stevens-Johnson syndrome, severe microbial infections and pterygium are examples of conditions that can lead to *limbal stem cell deficiency (LSCD)*. One can observe conjunctivalisation, i.e. ingrowth of the vascular and atransparent conjunctiva into the cornea. According to the degree of LSCD, the findings can be neovascularisation, persisting erosions and ulcers and ingrowth of fibrous tissue. The symptoms can be photophobia, pain, reduced vision and even blindness.

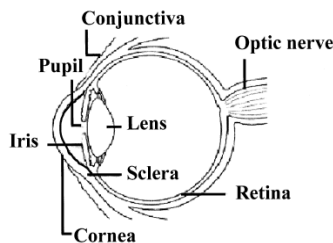
According to the new knowledge on LSC, we are now able to offer treatment for LSCD. Both auto-transplantation and allo-transplantaion of LSC have shown promising results. Other stem cells, like embryonic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow, have also shown good results in treating LSCD. Still, more research needs to be done to find the perfect treatment for LSCD.

This article serves as an overview of international literature on the area, and aims to give a summary of, and introduction to, the new knowledge on LSC and experiences in therapy of LSCD.

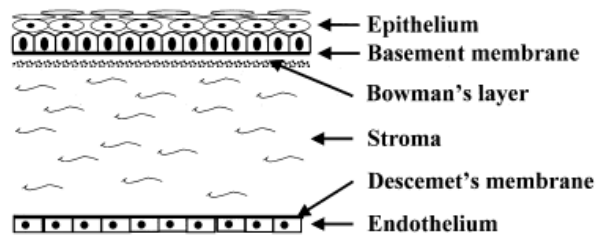
1	<i>Innledning</i>	4
2	<i>Materiale og metode</i>	4
3	<i>Limbale stamceller</i>	5
3.1	Limbale stamceller – finnes de?	5
3.2	Limbale stamcellers karakteristika	8
3.3	Limbale stamcellers mikromiljø	9
3.4	Limbal stamcellemangel.	10
3.5	Terapeutiske perspektiver	13
3.5.1	Erfaringer med autotransplantasjon	13
3.5.2	Erfaringer med allotransplantasjon	15
3.5.3	Erfaringer med andre typer stamceller	16
4	<i>Konklusjon</i>	17

1 Innledning

Cornea er øyets vindu mot verden, og eksponeres for de eksterne omgivelser. Fremre overflate dekkes av tårefilmen, og bakre overflate bader i kammervæsken. Corneas oppbygning kan histologisk deles inn i seks segment.



Figur 1. Enkel modell av øyet.



Figur 2. Illustrasjon av corneas segmentale inndeling.

Ytterst ligger det flerlagede, ikke-keratiniserte *plateepitellaget*. Deretter finnes epitelets *basalmembran*, *Bowmans membran*, *stroma*, *Descemets membran* og innerst *endotelceller*.¹ Den transparente og avaskulære cornea er kontinuerlig med den vaskulære conjunctiva og sclera, og overgangssonen mellom disse kalles *limbus*. Store krav stilles til corneaepitelets funksjon: Det skal være en ytre barriere mot mikrober og mekanisk skade, samt et optisk medium. Epitelcellenes lokalisasjon og funksjon nødvendiggjør en stadig selvfornyelse av epitellaget. Lenge har det ikke vært fullt ut kjent hvordan denne celledelingen finner sted. I løpet av de siste tiår har det imidlertid kommet mye ny kunnskap på dette området. Stamceller er ikke påvist uniformt fordelt i hele corneaepitelet, men snarere basalt i den vaskulære limbus. Man har sterke teorier om hvordan disse cellene prolifererer, transmigrerer og differensierer til modne corneaepitelceller. Ved alvorlig skade eller dysfunksjonalitet av de limbale stamceller vil conjunktivale epitelceller erstatte corneale, såkalt konjunktivalisering. Dette fører til neovaskularisering, kronisk betennelse, persisterende og kroniske epiteldefekter og i verste fall blindhet². Den nye kunnskapen vi nå har åpner for store terapeutiske muligheter og fremskritt.

Denne oppgaven gir en oversikt over internasjonal litteratur og forskning på området, og ønsker å gi en sammenfattende og oversiktlig innføring i ny kunnskap og terapierfaringer.

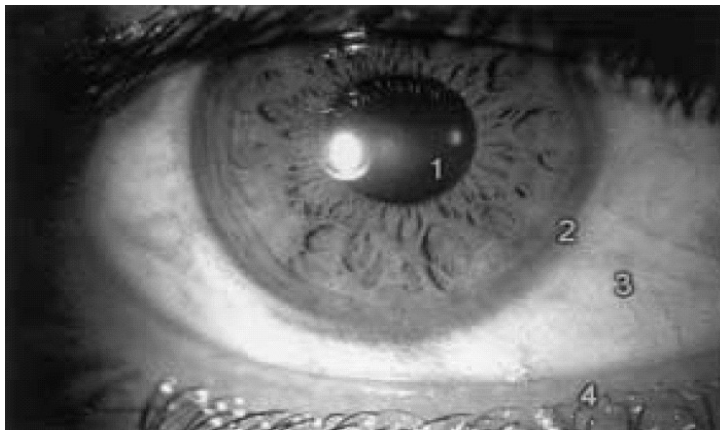
2 Materiale og metode

Det ble gjort litteratursøk i PubMed, Medline og Cochrane. Søketermene "(cornea* or limbal) and (stem or progenitor) and (cell or cells)" og "((cornea* or limbal) and (stem or progenitor) and (cell or cells)) and transplantation" ble benyttet. Søk ble foretatt i perioden august 2003 til desember 2005. Artikler ble sortert ut basert på forfatterens oppfatning av relevans for oppgaven. I tillegg er det benyttet referanser fra lærebøker og aktuelle artikler. Oppgaven har ikke som mål å gi en systematisk oversikt innen emnet, til det er vinklingen for vid. Oppgaven gir derimot en sammenfattende oversikt over flere emner innenfor publisert forskning på limbale stamceller, bl.a. i forhold til *påvisning* av limbale stamceller, limbale stamcellers *egenskaper og omgivelser*, *aktuelle sykdommer og skader* og *terapeutiske perspektiver*.

3 Limbale stamceller

3.1 Limbale stamceller – finnes de?

Randsonen mellom det corneale og conjunctivale epitelium kalles limbus, og representerer et spennende område på øyet. Her finnes rik vaskularisering og innervasjon. Tilstedeværelse av melanin gir området beskyttelse mot UV-stråler. Historisk sett var det Davanger og Evensen som i 1971 først antydte at corneas stamceller var lokalisert til limbus.³ Lenge har man manglet en spesifikk markør for limbale stamceller, og deres indisier for eksistens og lokalisasjon har vært basert på generelle kriterier for stamceller: *Lav differensieringsgrad med en primitiv fenotype, langsom celle-syklus i hvile, stort potensiale for proliferasjon etter aktivering og ubegrenset selvfornylseskapasitet.*



Figur 3. Den normale øyeoverflate, med pupill (1), limbus (2), sclera/conjunctiva (3) og nedre øyelokksrand (4).

Limbale stamcellers lave differensieringsgrad og primitive fenotype kan påvises ved immunohistokjemiske metoder. Særlig har man sett at spesifikke markører for modne corneaepitelceller, cytokeratinene K3 og K12, ikke uttrykkes hos limbale stamceller, men også andre markører for bl.a. connexin og metabolsk kapasitet viser det samme.^{4,5}

Langsom celle-syklus kan påvises ved å se på en celles evne til å beholde merket DNA over tid. En rekke studier har vist at celler basalt langs limbus har større evne til dette enn celler mer sentralt på cornea.^{6,7}

Flere studier har vist limbale stamcellers store potensiale for proliferasjon etter aktivering. Dette kan være i forbindelse med skadetilheling in vivo, eller ved stimulering in vitro.^{6,7,8,9} Videre har man via observasjoner av unormal sårtilheling på cornea etter fjerning av limbalt epitelvev kunnet ytterligere antyde stamcellefunksjonen til de limbale cellene.¹⁰ Det foreligger også studier som viser hvordan transplantasjon av populasjoner fra limbale epitelceller kan brukes til å gjenoppbygge hele corneaepitelet etter tilfeller med alvorlig skade på den okulære overflate.^{11,12} Et annet interessant moment i forhold til proliferasjon er at de fleste tumores på den okulære overflate oppstår nettopp i limbus.¹³

Evnen til ubegrenset selvfornylse har blitt vist gjennom ulike studier som ser på corneaepitelets evne til å klon seg selv under stimulering, samt overlevelsrate ved transplantasjon. Celler fra limbus har vist slike egenskaper.^{14,15}

Vi har ennå begrensede kunnskaper om hvordan stamcellene ligger fordelt mikroskopisk langs limbus' basale epitellag. Antakelig ligger stamcellene spredt utover basalmembranen i små grupper, som i kroppens flerlaget epitel for øvrig. Resultater fra forsøk som ser på den limbale cellemassens evne til å beholde radiomerket thymidin antyder at under 10 % av de basale cellene er stamceller.¹⁶ Det er vist at det basale epitellaget på limbus og cornea inneholder et hierarki av mitotiske celler. De limbale stamcellene troner øverst med sin langsomme cellyklus i hvile og lave differensieringsgrad. Dattercellene fra stamcellene har av flere forfattere blitt kalt *TAC* – transient amplifying cells. Disse progenitorcellene kan videre deles inn i tidlige og sene *TAC*. *TAC* ligner mye på limbale stamceller, men har en raskere cellyklus og en høyere differensieringsgrad. Etter hvert som tidlige *TAC* beveger seg sentripetalt fra limbus mot cornea, modnes de til sene *TAC*. Det er videre vist at perifere *TAC* har mulighet for multiple celledelinger, mens sentrale deler seg kun en gang.⁷

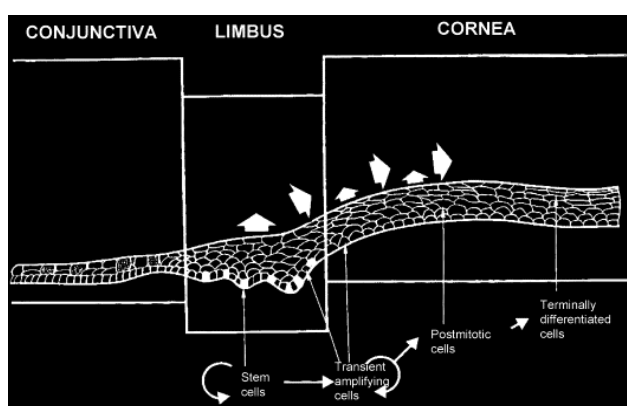
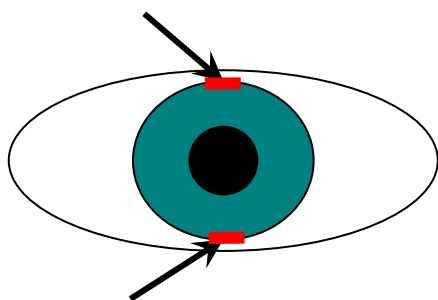


Fig. 4. Figuren viser stamcellenes basale, limbale lokalisasjon, relatert til Vogts palisader. Transient amplifying cells, *TAC*, beveger seg langs basale lag mot sentrum. Postmitotiske celler og terminalt differensierte celler finnes i de fremre cellelag.

En annen spennende, og noe ukjent, celletype er de såkalte *TC* – transitional cells. Disse finnes i små samlinger på 5-10 celler i transisjonssonen mellom perifer cornea og limbus. Oppsiktsvekkende viser det seg at disse cellene har en sterk regional heterogenitet: De finnes nesten utelukkende superiort og inferiort langs transisjonssonen, svært sjelden i temporale eller nasale del.^{17,18} *TC* karakteriseres elektronmikroskopisk av liten cellestørrelse, stor nukleoli, intermediære filamenter og mange hemidesmosomer. De kan skilles fra limbale stamceller ved at de uttrykker vimentin og K19. Derimot er de negative for K3.¹⁹ En kjenner ikke fullt ut funksjonen til *TC*, men hypoteser går ut på at de har stamcellekarakteristika eller at de representerer *TAC* i ulike stadier av migrasjon og proliferasjon. Det kan også tenkes at de har evne til å reverseres inn i stamcellepopulasjonen



Figur 5. Piler og markerte områder illustrerer den regionale heterogenitet for transitional cells (*TC*).

Corneale og conjunctivale epitelceller har forskjellige fenotypiske egenskaper, men i enhet danner de den normale *okulære overflate*. Begge celletyper samarbeider om å forsvare øyets fremre overflate mot mikrober og skader utenfra.²⁰ Corneaepitelet er av type flerlaget, ikke-keratinisert plateepitel. Epitellaget er konstant omtrent 50 µm over hele corneas overflate, og utgjør ca. 10 % av corneas tykkelse. Epitellaget består av fem til seks lag av celler. Tre forskjellige celletyper er beskrevet, og de representerer forskjellige differensieringsstadier. Fra fremre overflate og mot basalmembranen finner en: *Overflateceller* (to til tre lag), *vingceller* (to til tre lag) og *sylindriske basalceller* (ett lag). En slik inndeling av cellelag minner mye om epidermis, bortsett fra manglende keratinisering på cornea. Kun de sylindriske basalcellene har proliferative egenskaper, de andre to lagene er datterceller av disse og beveger seg gradvis mot den fremre overflaten.

Lenge har en manglet spesifikke markører for limbale stamceller, og det har derfor vært vanskelig å direkte bevise de limbale stamcellers eksistens. I følge tabell 1, ser vi at overflatemarkøren ABCG2 er sterk positiv kun for basalt limbalt epitelium, ellers negativ. ABCG2 er et transportprotein (ATP-binding cassette transporter G family) og er en spesifikk markør for en *rekke ulike stamceller*, bla. hematopoietiske, mesenkymale, muskulære, nevronale, kardiale, øyceller og keratinocytter.⁴¹ Verapamil blokkerer funksjonen til nettopp dette transportmolekylet.

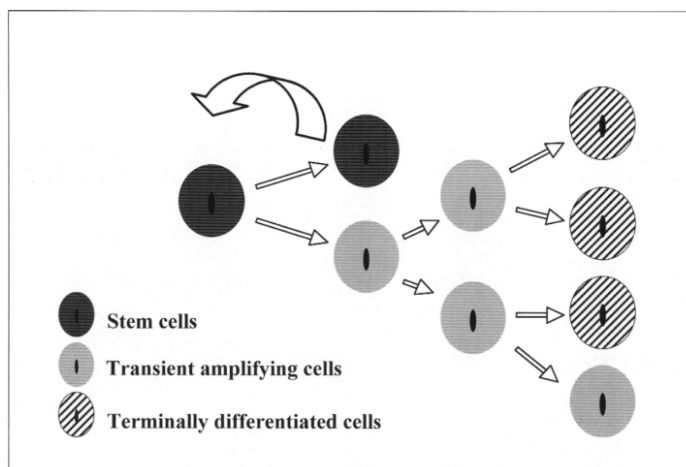
Tabell 1.⁴⁰ Semikvantitativ immunohistokjemisk lokalisasjon av stamcellemarkører i humant okulært overflateepitelium.

Markører	Corneale epitelium		Limbale epitelium		Conjunctivale epitelium	
	Basalt	Suprabasalt	Basalt	Suprabasalt	Basalt	Suprabasalt
<i>Intracellulære markører</i>						
Kearitin K3/K12	++	++	-	+	-	-
Keratin K5/K14	-(+)	-	+	(+)	++	-
Keratin K19	-	-	++	-	(+)	++
Vimentin	-	-	++	(+)	-	-
α-enolase	(+)	-	++	(+)	++	-
Metallothionein	-	+	(+)	+	-	+
p63	(+)	-	++	(+)	(+)	-
Nestin	++	++	-	-	-	-
<i>Overflatemarkører</i>						
Connexin 43	++	+	-	+	-	-
E-cadherin	++	++	(+)	++	(+)/+	++
P-cadherin	(+)	-	-/+	-	(+)	-
β-cadherin	++	++	++	++	++	++
Integrin α2	++	+	-/+	+	++	++
Integrin α3	++	+	-/+	+	++	+
Integrin α6	++	+	-/+	+	++	+
Integrin αv	++	+	++	+	++	+
Integrin β1	++	+	++	+	+	+
Integrin β2	+	+	+	+	+	+
Integrin β4	++	+	-/+	+	++	+
Integrin β5	+	-	+	(+)	+	-
Integrin α3β1	++	+	-/+	+	++	+
EGF-R	++	+	++	+	++	+
KGF-R bek	-	-	(+)	-	-	-
HGF-R met	(+)	-	(+)	-	-	-
NGF-R TrkA	+	(+)	+	-	-(+)	-
Transferrin-R CD71	-(+)	+	-(+)	+	-(+)	+
TGF-β-R1	++	+	++	+	++	(+)
TGF-β-R2	++	+	++	+	++	-
ABCG2	-	-	++	-	-	-

Tegnforklaring: - Ikke påvisbar, (+) svak positiv; + moderat positiv; ++ sterk positiv

3.2 Limbale stamcellers karakteristika

En stamcelle har evne til selvfornyelse og er samtidig kapabel til multidifferensiering og rekonstruksjon av ulike vevstyper. Embryonale stamceller hentet fra den indre cellemassen i blastocysten er pluripotente stamceller som har ubegrenset evne til selvfornyelse i et uddifferensiert stadium. Stamceller finnes i de fleste modne vevstyper i kroppen. Sammenlignet med embryonale stamceller har slike vevsspesifikke stamceller redusert evne til selvfornyelse. Nye studier viser allikevel at vevsspesifikke stamceller har evne til å differensiere til andre cellelinjer enn de som normalt finnes i det originale vev.²¹ Voksne stamceller finnes i et lite antall sammenliknet med somatiske celler i vev, og dette vanskeliggjør isolering.



Figur 6. Generelle prinsipper for limbale stamcellers syklus. Stamcellen (sort) er i stand til å fornye seg selv, samt differensiere videre til "transient amplifying cells", som videre kan fornye seg selv, samt differensiere videre.

Corneaepitelet ligner på mange måter kroppens øvrig epitel. Normal terminal differensiering er koblet med apoptose. Det har en sterk evne til å fornye seg selv, studier har vist at basale corneale epitelceller migrerer til overflaten i løpet av 4-6 dager²², hvor de dør og løses opp i tårevæsken. Lenge trodde man kilden til denne regenereringen var nettopp de basale corneale epitelceller. I dag vet vi at dette er en sannhet med modifikasjoner, da TAC er datterceller av limbale stamceller.

Cornea er avaskulært vev. I mesteparten av kroppsvevet for øvrig, initieres sårtilheling med blødning fra skadde blodårer. Koagulasjonsfaktorer og trombocytter aktiveres og spiller en sentral rolle. Sårtilheling på cornea derimot, må opplagt skje på et annet vis. *Epitelial migrasjon* er corneaepitelets initiale svar på skade.²³ Skadeområdets intakte naboceller sklir og migrerer mot skaden. I følge XYZ-hypotesen er epitelcellene i stadig dynamisk likevekt: Den epiteliale overflatedeskvasjonen (Z) er lik proliferasjon av basalceller (X) og proliferasjon og migrasjon av limbale celler (Y).²⁴ Altså vil nye epitelceller dannes fra de limbale stamcellene via ulike datterceller og modningsstadier, og erstatte det kontinuerlige celletapet ytterst på cornea som skyldes apoptose.

Tungsiripat et al.²⁵ så i sin studie på cornealt epiteliums levedyktighet ex vivo opptil 9 dager etter donorhøsting via et mikrokeratom. Det ble benyttet et lagringsmedium med 4° C. Teamet konkluderer med at basalt limbalt epitelium er signifikant mer levedyktig enn basalt sentralt epitelium og overflatisk både limbalt og sentralt epitelium. Dette

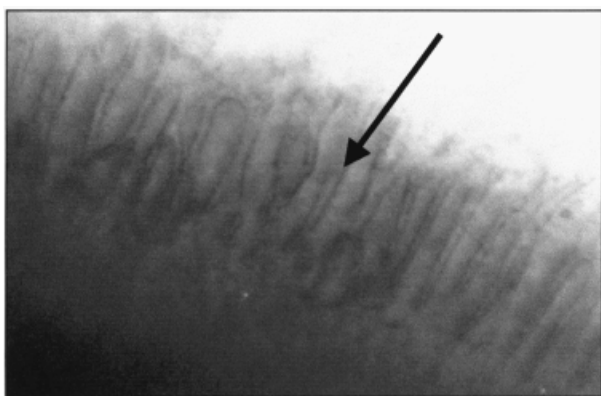
bekrefter at limbale stamceller er velegnet for donorhøsting og lagring, dessuten illustrerer det den limbale regionens hardhet.

3.3 Limbale stamcellers mikromiljø

I 1983 antydte Schofield at stamceller vedlikeholdes og kontrolleres av både intrinsiske og ekstrinsiske faktorer i deres lokale mikromiljø.²⁶ Disse faktorene skaper i samarbeid en balanse mellom opprettholdelse av stamcellene og videre differensiering.²⁷ Ennå er dette et felt hvor vi i dag har begrensede kunnskaper, og fremtiden vil nok gi mange spennende fremskritt. Men visse hovedtrekk og teorier kan vi nå belyse. To hovedkomponenter i de limbale stamcellenes mikromiljø er med på denne cellekontrolleringen: *Den limbale ekstracellulære matriks* og *den underliggende limbale stroma*.

I den limbale ekstracellulære matriks finner vi bl.a. basalmembranen, celle-celle-kontakter og celle-matriks-interaksjoner. Vi vet i dag at det er visse strukturelle forskjeller i basalmembranene til henholdsvis limbale og corneale områder.^{28,29} Bl.a. er det ulike kollagen IV-kjeder og laminin-kjeder. I den limbale basalmembranen er det funnet kollagen IV med $\alpha 1$ - og $\alpha 2$ -kjeder, og laminin med $\alpha 2$ - og $\beta 2$ -kjeder. I den corneale basalmembranen derimot, er det påvist kollagen IV med $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - og $\alpha 5$ -kjeder, og laminin med $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, $\gamma 1$ - og $\gamma 2$ -kjeder.^{28,30} Dessuten har forsøk med antistoff AE-27 vist en korrelasjon mellom keratin K3 og en heterogent fordelt basalmembrankomponent.²⁹ En antar derfor at ulikhetene i basalmembranene spiller en viss, om enn noe usikker, rolle overfor ulikhetene i basale limbale og corneale cellers fenotype, differensieringsgrad og proliferasjonsrate.^{28,31} Interaksjoner mellom celler og matriks viser også forskjeller mellom det corneale og det limbale området. I forhold til på cornea, er det langs limbus færre hemidesmosomer, en diskontinuerlig basalmembran, et nettverk av ankrende fibriller og en mer ujevn basaloverflate.³²

I den underliggende limbale stroma finnes stromale celler og blodårer. Her finnes et slynget nettverk som kalles Vogts palisader. Disse palisadene er en unik anatomisk struktur i øyet, og kan derfor brukes som en klinisk markør for å finne corneale stamceller. Vogts palisader tillater nærhet mellom blodårer og epitelium, og muliggjør god tilgang til næring og cytokiner fra blod.³³ Studier har vist at total mangel av Vogts palisader er nært forbundet med limbal stamcellemangel.³⁴ Videre er det beskrevet tre mekanismer som kan føre til at Vogts palisader forsvinner: 1) Tap av limbale stamceller pga. akutt skade, f.eks. etseskade eller Stevens-Johnson syndrom. 2) Kronisk epitelskade, f.eks. ved legemiddeltoksisitet eller strålingskeratitt. 3) Mangel pga. kongenital anomali, f.eks. aniridi.³⁵



Figur 7. Bilde av limbus som illustrerer Vogts palisader (pil).

Fibroblastceller spiller også en viktig rolle i forhold til cytokiner, og forsøk har demonstrert at kulturer med limbale epiteliale celler er avhengig av en co-kultur med fibroblaster for langsiktig overlevelse. Espana et al. har i tillegg vist hvordan limbale stamceller er avhengig av interaksjoner med mesenkymale celler for å unngå videre differensiering.³¹ Det er beskrevet tre ulike interaksjonsmønstre mellom cytokiner og stromale celler i cornea og limbus. *Type I-cytokiner* frigjøres fra corneale epitelceller med fibroblaster som målceller. Dette gjelder TGF α , interleukin-1 β og trombocyttderivert vekstfaktor BB. *Type II-cytokiner* inkluderer insulin-liknende vekstfaktor 1, TGF β 1 og β 2 og basal fibroblastvekstfaktor virker inn på aktiviteten til fibroblastene og epitelcellene. Dessuten har en vist at fibroblastene påvirker corneale epitelceller via *type III-cytokinene* KGF og HGF, og stimulerer proliferasjon og migrasjon.³⁵

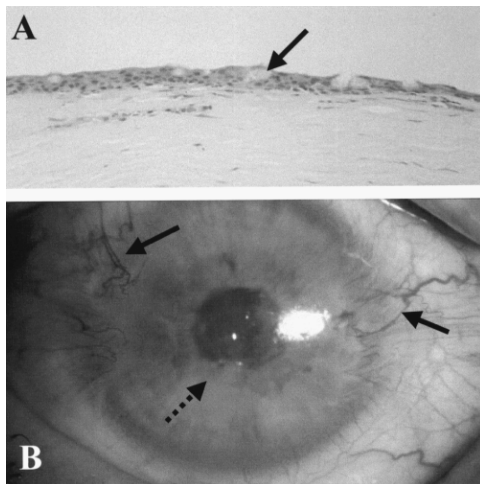
Interessant er det at det nylig er påvist ABCG2-positive celler langs *stromale* del av limbus. Dette tyder sterkt på at det her finnes stamceller. Forfatterne antyder at disse stamcellene gir opphav til keratocytter og videre fibroblaster ved aktivering. Ennå vet vi lite om forskjellene og likhetene mellom stromale og epiteliale stamceller. Begge celletyper er positive for ABCG2 og negative for keratin K12, og det kan være naturlig å anta at det er en sammenheng mellom dem.

En har funnet at amnionhinnens basalmembran på mange måter imiterer basalmembranen og mikromiljøet i limbus, og dette gir oss derfor et egnet medium for å preservere og dyrke opp udifferensierte limbale stamceller. I forbindelse med transplantasjon er dette svært aktuelt.³⁶ Ulike studier har også vist at transplantasjon av amnionhinne vil promotere corneal reepitelialisering. Dette kan skyldes amnionhinnens kjente evne til å hemme betennelse og dermed forhindre arrdannelse. De eventuelt gjenværende limbale stamcellene vil bli stimulert til ekspansjon og økt reepitelialisering.³⁷

3.4 Limbal stamcellemangel.

Ved skadet eller ikke normalt fungerende limbale stamceller vil en kunne observere *partiell* eller *total* limbal stamcellemangel. Videre vil dette få konsekvenser for corneas sårtilheling og integriteten til den okulære overflate.³⁸ De omliggende konjunktivale epitelcellene blir normalt hindret av limbale stamceller i å nærme seg den corneale overflate. Ved dysfunksjonelle stamceller vil en derfor kunne observere innvekst av konjunktivaepitel på cornea, såkalt konjunktivalisering. Dette virker tilsynelatende som en fornuftig kroppslig respons for å beskytte corneas stroma ved en overflatisk skade,

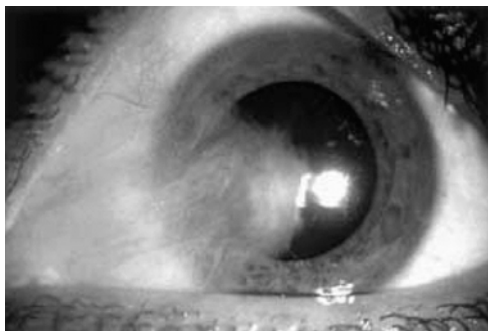
men konjunktivalt epitelium har en noe annen fenotype enn det optisk perfeksjonerte corneale epitelium. Forskjellige proteiner og keratiner uttrykkes, en ser vaskularisering og innvekst av mucinproduserende gobletceller.³⁹ Kronisk betennelse, tilbakevendende erosjoner, persisterende sår, ødeleggelse av basalmembranen og innvekst av fibrøst vev gir det kliniske bildet ved limbal stamcelle-mangel.⁴⁰ Typiske symptomer er fotofobi, smerte, nedsatt visus og i verste fall blindhet. På verdensbasis er dette et stort problem, mellom 8 og 10 millioner mennesker, særlig i u-landene, er rammet av corneal blindhet, uten tilgang til behandling.⁴¹ Behandling av alvorlige tilfeller av limbal stamcellemangel krever fornyelse av stamcellepopulasjonen for å regenerere hele corneas overflate og optiske funksjon.



Figur 8. Eksempel på konjunktivalisering. Epitelliale celler fra conjunctiva invaderer cornea. Et histologisk snitt (A) kan vise tilstedeværelse av gobletceller (pil) som normalt ikke finnes på cornea. Vaskularisering vises av svarte piler på bilde B. Stiplet pil demonstrerer et område uten transparente egenskaper.

I forhold til å planlegge en suksessfull behandling av en corneal skade er det essensielt å stille en riktig diagnose. Blant alle tegnene på limbal stamcellemangel, er kun konjunktivalisering spesifikk for diagnosen. Andre tegn som overflatisk vaskularisering, kronisk betennelse, ujevnt epitel, tilbakevendende erosjoner og persisterende epitelliale defekter med eller uten sår dannelse kan også observeres ved mange andre corneale sykdommer uten limbal stamcellemangel. Bekreftelse av konjunktivalisering kan gjøres ved å bekrefte tap av Vogts palisader under spaltelys, ved å utføre fluoresceinfarging som viser nedsatt epitellial barrierefunksjon eller ved impresjonscytologi. Blant disse tre diagnostiske ledetrådene har det vist seg at impresjonscytologi er mest presist for bekrefte limbal stamcellemangel.⁴² En tilfeldig undersøkelse uten cytologi for å bekrefte diagnosen limbal stamcellemangel kan resultere i unødvendig transplantasjon og systemisk immunosuppresjon for pasienten

Limbal stamcellemangel kan som nevnt tidligere deles inn i total eller partiell. Total kjennetegnes ved komplett tap av den limbale stamcellepopulasjonen med konjunktivalisering over hele corneas overflate som klinisk resultat. Partiell vil si at deler av den limbale stamcellepopulasjonen er bevart, områder på corneas overflate har en ekte corneal epitellial fenotype.⁴²



Figur 9. Eksempel på ervervet, *partiell* limbal stamcellemangel. Pterygium på venstre øye med nasal konjunktivalisering av cornea.



Fig 10.⁴³ Et eksempel på øyeskade ved Stevens-Johnson syndrom. Det foreligger *total* limbal stamcellemangel og cornea er ikke lenger transparent pga. vaskularisering, konjunktivalisering og arrdannelse.

Mangel på normalt fungerende limbale stamceller kan ha en rekke ulike årsaker. Hovedsakelig kan disse deles i to grupper, *erhvervede* og *primære*.

Tabell 2. Eksempler på sykdommer og skader som påvirker de limbale stamceller.

Ervervet	Primær
Kjemiske/termiske skader	Aniridi
Stevens-Johnson syndrom	Iriskolobom
Kontaktlinseindusert keratopati	Multiple endokrine mangler
Perifer ulcerativ keratitt	Epidermal dysplasi
Okulær cicatricial pemphigoid	
Alvorlig mikrobiell infeksjon	
Pterygium og pseudopterygium.	
Multippel øyekirurgi (iatrogen)	
Kryoterapi av limbalregionen (iatrogen)	
Medisinering (iatrogen)	
Kronisk limbitt	
Stråling	
Antimetabolitter	
Neoplasi	
Nevrotrofisk keratopati	
Idiopatisk keratopati	

Behandling av kjemiske okulære skader har lenge vært et vanskelig område innen oftalmologien. Skadene kan enten skyldes syre eller base. Baser har stor evne til å gi dype skader. Kjemiske skader kan resultere i blindhet. Behandlingen har som mål å hindre betennelse og videre celledøde, samt å fremme epitelialisering.

3.5 Terapeutiske perspektiver

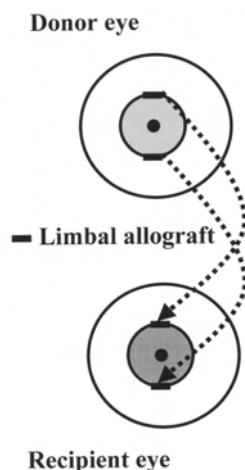
I takt med vår stadig økende forståelse av den normale corneaoverflates selvfornyelsesevner, dukker det opp spennende terapeutiske strategier for å behandle limbal stamcellemangel. Transplantasjon er ofte nødvendig for å fornye den okulære overflaten hos pasienter med en total limbal stamcellemangel. Ulike teknikker kan benyttes for å overføre stamceller til det affiserte øye. I tilfeller med partiell, eller unilateral total, limbal stamcellemangel kan det høstes limbale stamceller fra et friskt område av limbus på enten pasientens friske øye eller fra et øye med partiell limbal stamcellemangel. Dette kalles *autotransplantasjon*, og betyr at pasienten mottar kroppsegne celler. Ved total, bilateral skade kan det bli aktuelt å forsøke implantering av celler fra en donor, altså *allotransplantasjon*. Uheldigvis er det visse problemer assosiert med allotransplantasjon som må overvinnes. Dette gjelder tilgjengelighet på donorvev, samt frastøtingsreaksjon hos mottaker. Langtids immunosuppresjon kan derfor bli nødvendig for mottaker.

Hos pasienter med total limbal stamcellemangel er det kontraindikasjon mot *PKP* – *penetrerende keratoplastikk* alene. Dette skyldes at de corneale epiteliale progenitorcellene fra et slikt cornealt graft har begrenset livslengde. Etter noe tid vil det transplanterte området bli erstattet av invaderende vaskularisert vev, som videre kompliseres med immunologisk frastøting og sekundært glaukom.⁴⁴ Hvis man derimot kombinerer PKP eller *LKP* – *lamellær keratoplastikk* med limbal transplantasjon får man et nyttig kirurgisk verktøy mot total limbal stamcellemangel.⁴⁵

Cornea innehar en immunpriviligert status som resulterer i en lav forkastningsrate ved u-matchet allograft. Det ser ut til at disse forkastelsesreaksjonene skyldes antigenpresenterende celler i donorvevet, og ikke vertens egne stromale keratocytter. Bl.a. finnes dendritiske celler klasse II og makrofager i den normale corneas stroma og epitelium, som teoretisk kan initiere direkte immunreaksjoner.⁴⁶

3.5.1 Erfaringer med autotransplantasjon

Det er rapportert en rekke vellykkede autotransplantasjoner ved unilateral eller partiell limbal stamcelleskade, og dette bør bli standard behandling. En slik autotransplantasjon kan foregå på to måter, enten *direkte* transplantasjon via uthenting av en større limbal del fra pasientens friske donorøye, eller *indirekte* hvor en mindre limbal biopsi fra det friske donorøyet dyrkes og ekspanderes før transplantasjon. Direkte transplantasjon er enklere og mindre tidkrevende å utføre, men det friske donorøyet utsettes for en større skaderisiko. Indirekte transplantasjon krever mer tid, ressurser og kunnskap, men donorøyet utsettes for en mindre skaderisiko.¹⁴ Indirekte transplantasjon er dessuten å foretrekke ved visse stadier av partiell skade på donorøyet, hvor en ikke ønsker å fjerne for stor andel av de gjenværende, friske stamcellene. Sangwan et al.⁴⁷ demonstrerer i sin studie vellykket indirekte transplantasjon, ved at de ekspanderer opp høstede limbale cellekulturer og transplanterer disse til pasientens skadede øye, med gode resultater.



Figur 11. Forenklet modell som viser prosessen ved *direkte* transplantasjon. Limbale biopsier høstes fra f.eks. pasientens friske øye eller en levende slektning og såes inn hos mottakerøyet med limbal stamcellemangel.

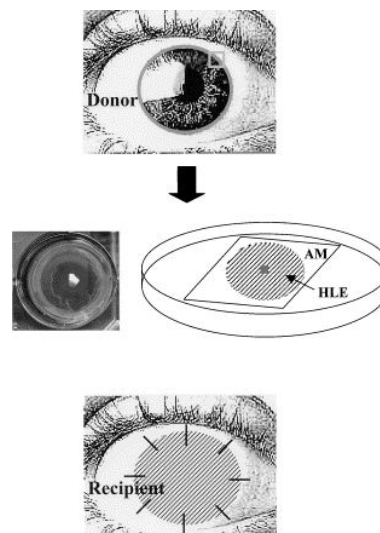


Fig. 12. Eksempel på flytdiagram ved *indirekte* transplantasjon. Det gjøres ekspansjon på amnionmembran (AM). Et graft av AM og ekspandert humant limbalt epitel (HLE) transplanteres til mottakerøyet etter omtrent 3-4 ukers dyrkning.

Det er altså en avveining mellom risiko for iatrogen skade ved donering mot oppnådd positiv effekt ved transplantasjon. Rapporterte komplikasjoner på donorøyet er lokalisert tåkesyn, pseudopterygium, filamentær keratitt, mikroporforasjon og corneal nedsynkning.

Studier har vist gode resultater ved uthenting av hhv. 50 %¹² og 1/3⁴⁸ av limbalt vev til bruk ved direkte autotransplantasjon. Ingen komplikasjoner ble observert på donorøyet. Ivekovic et al. benyttet seg av to 3-timer-store graft, til sammen 50 %, og heller ikke her ble det observert skader på donorøyet. Studien viste videre at bruk av autolog limbal transplantasjon var nyttig hos pasienter med unilateral stamcellemangel i forhold til neovaskularisering, betennelse og visus. Kombinert med bruk av amnionhinnetransplantasjon, *AMT*, ble det observert ytterligere reduksjon av betennelse og konjunktivalisering.

Nakamura et al.⁴⁹ beskriver et vellykket tilfelle av indirekte autotransplantasjon. Limbale stamceller ble høstet med en biopsi på 3 mm² fra pasientens donorøye. Andre forfattere har vist at en biopsi på omtrent 2 mm² har vist seg å være tilstrekkelig.⁵⁰ Cellene ble dyrket og ekspandert på human amnionhinne i tre uker, og det ble da påvist et veldifferensiert cornealt epitelium med 4-5 lag. Deretter ble amnionhinnen og celledaget transplantert til pasientens alvorlig syreskadde øye. En terapeutisk kontaktlinse beskyttet det opererte øyet. 19 måneder senere observerte man et stabilt okulært overflateepitelium uten noen epiteliale defekter. Pasientens visus var 20/20 mot 8/200 før operasjonen. Disse resultatene er gledelige, men studien sier dessverre intet om videre langtidsresultat. Dessuten er det en svakhet at studien kun beskriver ett kasus.

3.5.2 Erfaringer med allotransplantasjon

Over lengre tid har det pågått en diskusjon om hvorvidt allotransplanterte limbale stamceller faktisk overlever hos sin vert og er i stand til å gi opphav til nye epitelceller. En rekke studier har forsøkt å bevise donorcellers eksistens hos verten ett eller flere år etter limbal transplantasjon. Ulike metoder er brukt i forhold til immunosuppresjon og høsting og påvisning av celler, og dette har sannsynligvis gitt de vekslende resultatene.

En studie utført av M. Egarth et al.⁵¹ konkluderte med at det er en noe uklar korrelasjon mellom langtidsoverlevelse av humane donorstamceller og behandlingsresultat i form av en optisk klar cornea. Ved hjelp av forskjellige kjønnskromosomer mellom donor og vert, kunne man ved FISH-teknikk skille donorceller fra vertsceller. Forskerteamet benyttet HPCLK (*homologous penetrating central limbal keratoplasty*) på ett øye til syv aktuelle pasienter, og fant at fem pasienter hadde optisk klar cornea etter mellom 365-1355 dager, og hos kun to pasienter ble det påvist donorceller. Begge pasientene med påviste donorceller hadde optisk klar cornea. At man hos de resterende tre i denne gruppen ikke kunne påvise donorceller er uventet. Forfatterne antyder at dette kan skyldes at transplanterte stamceller endrer vertens corneolimbale *mikromiljø* på en gunstig måte i forhold til reepitelialisering. Denne studien har visse svakheter ved metodene som ble benyttet for å høste celler til identifikasjon, nemlig via fjernet suturering. Forfatterteamet forsvarer sin metode på bakgrunn av økt skånsomhet for pasientens øye. Metoden har lav sensitivitet for påvisning av donorceller, og en kan ikke utelukke at upåviste donorceller faktisk var representert i cornea.

Djalilian et al.⁵² understreker viktigheten av å hindre en immunologisk reaksjon og å opprettholde en normal okulær tårefilm for å sikre langtidssuksess ved limbale allotransplantasjoner. I sin studie kunne de ved hjelp av PCR-teknikk hos tre av tre pasienter påvise donorceller på det corneale epitel opptil 3,5 år etter transplantasjon. Systemisk immunosuppresjon ble benyttet. Det ble gjort mikrodisseksjon med laser for å hente ut celler. Dette ga et rent materiale med liten sannsynlighet for forurensing fra stroma eller conjunctiva. Ved PCR er det spesielt viktig med et rent materiale pga. den høye sensitiviteten. I de fleste studier som har mislyktes i å påvise donorceller er det enten benyttet inadekvat immunosuppresjon, eller rekrutterte pasienter med gjentakende limbal stamcellemangel eller kun delvis limbal stamcellemangel.

Shimazaki et al.⁵³ analyserte epitelceller fra den parasentrale cornea på 10 øyne over 300 dager etter limbal transplantasjon, og kunne påvise donorceller på totalt 8 øyne. Donorceller ble påvist opptil 888 dager etter transplantasjon. Det ble gitt systemisk immunosuppresjon i form av kortison og cyclosporin.

Santos et al.⁵⁴ evaluerte i sin studie 33 øyne hos 31 pasienter med total limbal stamcellemangel pga Stevens-Johnson syndrom eller kjemisk skade som gjennomgikk limbal allograft med AMT. Resultatet ble vellykket i forhold til overlevelse av transplantat og corneal reepitelialisering i 46 % ett år postoperativt, og 39 % tre år postoperativt. En antar at livslengden til TAC er under ett år, så opprettholdelse av et normalt corneaepitelium over ett år avhenger av levende og funksjonelle stamceller.⁵⁵ Santos et al. påpeker også viktigheten av preoperative epiteliale vedlikeholdsprosedyrer. Ved Stevens-Johnson syndrom er det spesielt viktig å forebygge tørre øyne preoperativt for å oppnå et vellykket kirurgisk resultat ved AMT og keratolimbale allograft.

Chen et al. undersøker i sin studie virkningen av immunosuppresjon ved limbale allograft hos rotter. Rotter i gruppe a) ble behandlet med systemisk cyclosporin A og topisk deksametason samt cyclosporin A (n=25). Rotter i grupper b) mottok ingen form for immunosuppresjon (n=25). En kontrollgruppe c) bestod av rotter med identisk HLA-struktur som transplantatet, altså isograft. Resultatene i gruppe b) ble 80 % klinisk uforlikelighetsreaksjon med økende ødem og betennelse etter dag 7 (median). I gruppe a) observerte man derimot 0 % klinisk uforlikelighetsreaksjon etter 2 måneder. Det ble ikke funnet signifikant forskjell i transplantatoverlevelse mellom gruppe a) og c). Forfatterne poengterer derfor viktigheten av immunosuppresjon ved limbal allotransplantasjon. En svakhet ved studien er at den ikke undersøker forskjeller mellom topisk og systemisk immunosuppresjon. Langvarig behandling med systemisk immunosuppresjon disponerer for bl.a. generelle infeksjoner og tumores, og er ikke å foretrekke for kroppen forøvrig.

Andre studier har vist et vellykket resultat etter 1-2 år i forhold til fotofobi, neovaskularisering og visus på mellom 82 % og 100 %. Studier som derimot ser på resultatene etter 3-5 år har en lavere suksessrate, nemlig mellom 44 % og 80 %.

Tabell 3. Studier som rapporterer resultater etter keratolimbale allograft kan summeres i en tabell, etter Espana et al. :

Forfattere	År	n	Median oppfølgingstid i mnd	Forbedret visus (%)*	Forbedret corneal overflate (%)**	Immunosuppresjon
<i>I. Korttids oppfølging</i>						
Tsai og Tseng ⁵⁶	1994	16	18,5	82	100	CsA
Tsubota et al.	1995	9	12	100	100	CsA/Dexametason
Tan et al. ⁵⁷	1995	9	14	100	77	CsA
Dua et al. ⁵⁸	1999	6	11,8	84	100	FK-506
<i>II: Langtids oppfølging</i>						
Holland ⁵⁹	1996	25	27	66	62	CsA
Tsubota et al. ⁶⁰	1999	43	23	60	51	CsA/Dexametason
Shimazaki et al. ⁶¹	2000	29	72	48	45	CsA/Dexametason
Solomon et al. ⁶²	2001	39	34	44,6	23,7	CsA
Ikari et al. ⁶³	2002	23	60	82,6	75,8	CsA
* Forbedret visus er definert som en bedring på minst to linjer på Snellen's test. ** Forbedret corneal overflate er definert som epitelialisering og bedret klarhet og jevnhet.						

3.5.3 Erfaringer med andre typer stamceller

Nyere studier har sett på mulighetene for å indusere corneaepiteliale progenitorceller fra andre stamceller enn de limbale stamcellene. Ma et al.⁶⁴ presenterer en ny kilde for autotransplantasjon ved limbal stamcellemangel, nemlig *mesenkymale stamceller (MSC) fra benmarg*. Humane MSC og limbale stamceller ble sådd og dyrket på human amnionhinne. Det ble indusert skade på limbus og cornea hos rotter med NaOH, en uke senere ble det transplantert inn amnionhinne med de dyrkede cellene. Dexametason ble gitt lokalt for å hemme betennelse og immunreaksjon. 4 uker etter transplantasjonen fant man henholdsvis *transparent cornea* og *ingen neovaskularisering* hos 56,3 % og 50 % som fikk amnionhinne med MSC (N=16), 62,5 % og 62,5 % som fikk amnionhinne med limbale stamceller (N=8), 42,9 % og 28,6 % som kun fikk amnionhinne (N=7), og 16,7 % og 0 % som kun fikk dexametason (N=6).⁶⁴ Overraskende kunne man derimot ikke påvise corneaepitelceller

som uttrykte keratin K3 i gruppen som mottok MSC, noe man gjorde i gruppen som mottok limbale stamceller. Forfatterne antyder at den observerte gode terapeutiske effekten ved MSC derfor delvis kan forklares via cellenes evne til å hemme både betennelse og betennelsesrelatert angiogenese, og ikke cellenes evne til å differensiere til cornealt epitel. Resten av forklaringen er ennå ukjent, men MSC kan vise seg å bli fremtiden for autotransplantasjon ved bilateral limbal stamcellemangel. I motsetning til limbale stamceller er det god tilgang til MSC hos pasienten selv, og hele auto-prinsippet frigjør behovet for langvarig immunsuppresjon. Det er uansett behov for mer forskning før behandlingen kan anbefales på pasienter. Aktuelle studie sier dessverre intet om langtidsprognose, og dette vil det være svært interessant å kartlegge.

Homma et al.⁶⁵ så i sin studie på hvordan *embryonale stamceller (ES)* kunne differensieres til corneaepiteliale progenitorceller hos mus. Teamet lyktes med å dyrke frem pax-6-, keratin K12- og E-cadherin-positive celler in vitro på kollagen type-IV med ES som moderceller. Cellene ble videre transplantert til skadet cornea hos mus og dette resulterte i full reepitelialisering innen 24 timer. Cellene ble senere undersøkt og funnet positive for donormarkører. Dette viser at ES er en kilde til corneaepitelceller, noe som er svært lovende. Metoden krever derimot i de fleste tilfeller langvarig immunsuppresjon. Også her trengs mer forskning og kunnskap før dette kan bli anbefalt behandling for pasienter. Langtidsprognose vet vi lite om. Forskning på humane embryonale stamceller er kraftig regulert av norsk lov.

4 Konklusjon

Det er i dag liten tvil om de limbale stamcellers eksistens. Imidlertid er det ikke beskrevet en markør som er helt spesifikk for de limbale stamceller. Transportproteinet ABCG2 er nok den beste enkeltmarkør vi har, og kan brukes for å påvise stamceller i basale limbus. ABCG2 er positiv også for en rekke andre stamceller, og er således ikke spesifikk. Andre metoder som kan brukes for å påvise limbale stamceller er å se på generelle stamcellekriterier som f.eks. lav differensieringsgrad med primitiv fenotype, langsom celledykningsrate i hvile og evne til selvfornyelse og videre differensiering.

Corneaepitelet har høyt spesialiserte oppgaver i form av å være øyets ytre barriere mot omgivelsene, samt et svært nøyaktig optisk medium. Det har en sterk evne til å fornye seg selv, og det er vist at dette skjer på mellom 4 og 6 dager. De limbale stamceller gir opphav til såkalte TAC- transient amplifying cells, som via transmigrasjon mot sentrum, proliferering og differensiering gir corneaepitel. Limbale stamceller er derfor helt essensielle for et velfungerende corneaepitel. Ennå har vi begrensede kunnskaper om limbale stamcellers mikromiljø. Det er nødvendig med mer forskning på hvilke faktorer som styrer stamcellenes skjebne. Unikt for den underliggende limbale stroma er at det her finnes et slynget nettverk som kalles Vogts palisader. Dette tillater nærhet til blodårer, og muliggjør god tilgang til både næring og cytokiner. Studier har også vist at fibroblaster er nødvendig for å holde stamcellene velregulert. Amnionhinnens basalmembran imiterer på mange måter basalmembranen og mikromiljøet i limbus, og er derfor velegnet som medium for preservering og dyrking av stamceller.

Limbal stamcellemangel kan deles inn i hhv. partiell og total, og ervervet og primær. Innvekst av konjunktivalt epitel på cornea, såkalt konjunktivalisering, representeres i form av nedsatte transparente egenskaper, neovaskularisering, sårdannelse, nedsatt visus/blindhet, fotofobi og smerte. Behandling av alvorlige tilfeller av limbal stamcellemangel har lenge vært

en stor utfordring for oftalmologien. En skiller mellom autotransplantasjon (kroppsegne celler) og allotransplantasjon (kroppsfremmede celler). En kan også skille mellom direkte og indirekte transplantasjon. Ved direkte er det ingen dyrking og ekspansjon av cellene, noe en gjør ved indirekte. Direkte transplantasjon er således en enklere metode, men utsetter donorøyet for en større risiko. Indirekte transplantasjon er tid- og kunnskapskrevende, men er mer skånsomt for donorøyet. Autotransplantasjon unngår behovet for immunsuppresjon, og bør benyttes fremfor allotransplantasjon der det er mulig. Allotransplantasjon krever langvarig immunsuppresjon for et vellykket resultat. Det foreligger lite dokumentasjon på hvilken immunsuppresiv behandling som bør være førstevalg i forhold til varighet, administrasjonsform og type, og her er det behov for mer forskning.

En rekke studier viser gode resultater ved både autotransplantasjon og allotransplantasjon, og dette bør være førstevalgsbehandling ved alvorlig limbal stamcellemangel. Imidlertid er det lite dokumentasjon på langtidsprognose etter transplantasjon, og også her vil det være interessant med flere studier. Forsøk med andre stamceller, f.eks. embryonale stamceller og mesenkymale stamceller fra benmarg har vist lovende resultater, og åpner for nye kilder til transplantasjonsbehandling.

¹ T Nishida. Basic science: Cornea, sclera, and ocular adnexa anatomy, biochemistry, physiology, and biomechanics.

² W Chen, L Cao, K Hara, T Yoshitomi. Effect of immunosuppression on survival of allograft limbal stem cells. *Jpn J Ophthalmol* 48:440-447, 2004.

³ Davanger M, Evensen A. Role of pericorneal papillary structures in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229: 560-561, 1971

⁴ Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 31: 448-456, 1990

⁵ Matic M et al. Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolic transfer capacity. *Differentiation* 61: 251-260. 1997

⁶ Tseng SC, Zhang SH. Limbal epithelium is more resistant to 5-fluorouracil toxicity than corneal epithelium. *Cornea* 14:394-401, 1995.

⁷ Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: Modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J. Cell Sci.* 111:2867-2875, 1998

⁸ Hernandez G, Theiss C, Steuhl KP, Meller D. Expression of delta Np63 on response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane. *Invest Oph. Vis. Sci* 44: 2959-2965. 2003.

⁹ Kruse FE, Tseng SC. Retinoic acid regulates clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 2405-2420, 1994

¹⁰ Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31: 1301-1314, 1990.

¹¹ Tsai RJ, Sun TT, Tseng SC. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology* 97:446-455, 1990.

¹² Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96: 709-722, 1989.

¹³ Waring GO, Roth AM, Ekins MB. Clinical and pathologic description of 17 cases of corneal intraepithelial neoplasia. *Am. J. Ophthalmol.* 97: 547-559, 1984

¹⁴ Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, Kenyon KR, Rheinwald JG. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2672-2679, 1993.

¹⁵ Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, de Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiation progeny in the human ocular surface. *J. Cell. Biol.* 145:769-782, 1999.

¹⁶ Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Cotsarelis G, Sun TT. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32: 1864-1875. 1991.

¹⁷ Wiley L, SundarRaj N, Sun TT, Thoft RA. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: An immunohistochemical evaluation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32:594-602, 1991.

¹⁸ Lauweryns B, van den Oord JJ, De Vos R, Missotten L. A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34:1983-1990, 1993.

- ¹⁹ Lauweryns B, van den Oord JJ, Missotten L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 1991-1990, 1993.
- ²⁰ Thoft RA, Friend J, Kenyon KR: Ocular surface response to trauma, *Int Ophthalmol Clin* 19:111-112, 1979
- ²¹ Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002.
- ²² Hanna C, O'Brien JE: Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol* 64:536, 1960
- ²³ Binder PS, Wickham MG, Zavala EY et al: Corneal anatomy and wound healing. In Baraque JJ et al: Symposium on medical and surgical diseases of the cornea, St Louis, 1980, Mosby.
- ²⁴ Thoft RA, Friend J: The X, Y, Z, hypothesis of corneal epithelial maintenance, *Invest ophthalmol Vis Sci* 24:1442-1443, 1983
- ²⁵ Tungsiripat T, Sarayba M, Taban M, Sweet P, Osann K, Chuck R. Viability of limbal epithelium after anterior lamellar harvesting using a microkeratome. *Ophthalmology* 111: 469-475, 2004
- ²⁶ Schofield R. The stem cell system. *Biomed. Pharmacother.* 37: 375-380, 1983.
- ²⁷ Watt FM, Hogan BL. Out of eden: Stem cells and their niches. *Science* 287: 1427-1430, 2000.
- ²⁸ Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC. Human corneal basement membrane heterogeneity: Topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab. Invest.* 72: 461-472, 1995.
- ²⁹ Kolega J, Manabe M, Sun TT. Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation* 42: 54-63. 1989.
- ³⁰ Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea* 18: 73-79, 1999.
- ³¹ Espana EM, Kawakita T, Romano A, di Pascuale M, Smiddy R, Liu C, Tseng SCG. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:5130-5135, 2003.
- ³² Gipson IK, The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye* 3: 132-140, 1989.
- ³³ Daniels JT, Dart JKG, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. *Wound Rep. Reg.* 9: 483-494, 2001.
- ³⁴ Kinoshita S, et al. Characteristics of human ocular surface epithelium. *Progress in retinal and eye research*, volume 20, issue 5, 2001.
- ³⁵ Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J. Cell Physiol.* 163: 61-79, 1995.
- ³⁶ Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: Amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv. Ophthalmol.* 48: 631-646, 2003.
- ³⁷ Ivekovic R, Tedeschi-Reiner E, Novak-Laus K, Andrijevic-Derk B, Cima I, Mandic Z. Limbal graft and/or amniotic membrane transplantation in the treatment of ocular burns. *Ophthalmologica* 219: 297-302, 2005.
- ³⁸ Dua HS et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye* 17, 877-885, 2003.
- ³⁹ Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br. J. Ophthalmol* 82: 1407-1411, 1998.
- ⁴⁰ Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells, *Experimental Eye Research* 81: 247-264, 2005
- ⁴¹ Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. Stem cells express online, 2005.
- ⁴² Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, Solomon A, Tseng SCG. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye* 18; 406-417, 2004.
- ⁴³ Ang LPK, Tan DTK. Ocular surface stem cells and disease: Current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singapore* 33, 576-580, 2004.
- ⁴⁴ Dogru M, Tsubota K. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 140: 305-306, 2005
- ⁴⁵ Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 102: 1486-1496, 1995.
- ⁴⁶ Streilein JW. New thoughts on the immunology of corneal transplantation. *Eye* 17: 943-948, 2003.
- ⁴⁷ Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods. *Bioscience Reports* 23:169-174, 2003.
- ⁴⁸ Tand DTH, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 103: 29-36, 1996.
- ⁴⁹ Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol. Scand.* 82:468-471, 2004.

-
- ⁵⁰ Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplanted in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108: 1569-1574, 2001.
- ⁵¹ Egarrth M, Hellkvist J, Claesson M, Hanson C, Stenevi U. Longterm survival of transplanted human corneal epithelial cells and corneal stem cells. *Acta Ophthalmol. Scand.* 83: 456-461, 2005.
- ⁵² Djalilian AR, Mahesh AP, Koch CA, Nussenblatt RB, Shen D, Zhuang Z, Holland E, Chan C. Survival of donor epithelial cells after limbal stem cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 803-807, 2005.
- ⁵³ Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N, et al. Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1664-1668, 1999.
- ⁵⁴ Santos MS, Gomes JAP, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Romano AC, Belfort R. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 140: 223-230, 2005.
- ⁵⁵ Tsubota K. Corneal epithelial stem cell transplantation. *Lancet* 349: 1556, 1997.
- ⁵⁶ Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 13: 389-400, 1994.
- ⁵⁷ Tan DTH, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology* 103: 29-36, 1996.
- ⁵⁸ Dua HS, Azura-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 83: 414-419, 1999.
- ⁵⁹ Holland EJ. Epithelial transplantation for the management of severe ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 94: 677-683, 1996.
- ⁶⁰ Tsubota K, Satake Y, Kaido M et al. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Eng J Med* 340:1697-1703, 1999.
- ⁶¹ Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 107: 1518-1523, 2000.
- ⁶² Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhammi A, Grueterich M, Espana EM et al. Long term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 109: 1559-1566, 2002.
- ⁶³ Ikari L, Daya SM. Long term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109: 1278-1284, 2002.
- ⁶⁴ Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Express Online* August, 2005.
- ⁶⁵ Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, Kurokawa M, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4320-4326, 2004.